

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-6070

(P2017-6070A)

(43) 公開日 平成29年1月12日(2017.1.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A 2 G 0 0 1
<b>G O 1 N 21/64 (2006.01)</b>	G O 1 N 21/64	F 2 G 0 4 3
<b>G O 1 N 23/04 (2006.01)</b>	G O 1 N 23/04	4 B O 2 4

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2015-126296 (P2015-126296)	(71) 出願人	301022471 国立研究開発法人情報通信研究機構 東京都小金井市貫井北町4-2-1
(22) 出願日	平成27年6月24日 (2015.6.24)	(74) 代理人	110000556 特許業務法人 有古特許事務所
		(72) 発明者	小林 昇平 東京都小金井市貫井北町4-2-1 国立 研究開発法人情報通信研究機構内
		(72) 発明者	原口 徳子 東京都小金井市貫井北町4-2-1 国立 研究開発法人情報通信研究機構内
		Fターム(参考)	2G001 AA03 BA11 CA03 GA12 HA13 KA20 LA01 2G043 AA03 BA14 CA05 DA01 EA01 FA02 FA03 KA02
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞内膜構造形成方法および細胞内膜構造観察方法

(57) 【要約】

【課題】生細胞内の特定の位置に細胞内膜構造を形成することができる、細胞内膜構造形成方法を提供することを目的とする。

【解決手段】標識された目的分子を保持する培養細胞を調製する工程と、前記標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子が表面に結合した粒子を前記培養細胞に導入する工程とを有し、前記粒子の周囲に膜構造を形成する、細胞内膜構造形成方法。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

標識された目的分子を保持する培養細胞を調製する工程と、  
前記標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子が表面に結合した粒子を前記培養細胞に導入する工程とを有し、  
前記粒子の周囲に膜構造を形成する、細胞内膜構造形成方法。

**【請求項 2】**

前記粒子がプラスチックビーズまたは磁気ビーズである、請求項 1 に記載の細胞内膜構造形成方法。

**【請求項 3】**

前記目的分子の標識が蛍光タンパク質であり、  
前記標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子が前記蛍光タンパク質に対する抗体である、請求項 1 または 2 に記載の細胞内膜構造形成方法。

**【請求項 4】**

前記目的分子が、B A F、R a n、およびインポーティン からなる群から選択される 1 以上のタンパク質である、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の細胞内膜構造形成方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 - 4 のいずれか 1 項に記載の細胞内膜構造形成方法により形成された細胞内膜構造を蛍光顕微鏡法もしくは電子顕微鏡法、またはそれらを組み合わせた方法により観察する、細胞内膜構造観察方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、細胞内膜構造形成方法および細胞内膜構造観察方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

細胞内には核膜や小胞体膜をはじめとする様々な細胞内膜構造が存在する。これらの膜は単に脂質分子からなる脂質二重層ではなく、膜タンパク質等の様々な生体分子を構成成分とする非常に複雑な構造体である。

**【0003】**

細胞内膜構造の構成成分や形態は、細胞の薬剤処理や細胞への病原体侵入といった環境変化に応じてダイナミックに変化するため、生細胞内における細胞内膜構造の特性解析は困難である。このため、生細胞内ではなく試験管内で細胞内膜構造を形成して、その形成過程を解析する方法が開発されている。

**【0004】**

試験管内の反応により、細胞内膜構造を形成する方法としては、細胞をつぶして得た細胞抽出液を用いる方法と、人工的に合成した生体分子を溶液中で混ぜ合わせたものを用いる方法とがある。前者の例としては、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた核膜形成法が挙げられる（非特許文献 1）。後者の例としては、リポソーム膜を用いて、細胞内分解経路の一種であるオートファジー機構に参与する膜タンパク質の機能を解析した例が挙げられる（非特許文献 2）。

**【0005】**

また、生体分子を結合させたプラスチックビーズを生きたヒト培養細胞内に導入することにより、細胞が持つ生体分子分解機構の一つである「オートファジー」をビーズ周囲に限定して誘導する方法が報告されている（非特許文献 3）。そして、オートファジーはビーズそのものではなくビーズの侵入によって生じた細胞膜の断片を標的として誘導されることが示唆されている（非特許文献 4）。

**【先行技術文献】**

10

20

30

40

50

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献1】 Chuanmao Zhang and Paul R. Clarke, Science, 2000, Vol. 288, pp.1429 1432

【非特許文献2】 Nakatogawa, H., et al., Cell, 2007, Vol. 130, pp.165 178

【非特許文献3】 Kobayashi, S., et al., Autophagy, 2010, Vol. 6, pp.36 45

【非特許文献4】 Fujita, N., et al., J. Cell Biol., 2013, Vol. 203, pp.115 128

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本発明は、生細胞内の特定の位置に細胞内膜構造を形成することができる、細胞内膜構造形成方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

本発明の第一は、標識された目的分子を保持する培養細胞を調製する工程と、前記標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子が表面に結合した粒子を前記培養細胞に導入する工程とを有し、前記粒子の周囲に膜構造を形成する、細胞内膜構造形成方法に関する。

## 【0009】

前記粒子がプラスチックビーズまたは磁気ビーズであることが好ましい。

## 【0010】

前記目的分子の標識が蛍光タンパク質であり、前記標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子が前記蛍光タンパク質に対する抗体であることが好ましい。

## 【0011】

前記目的分子が、BAF、Ran、およびインポーチン からなる群から選択される1以上のタンパク質であることが好ましい。

## 【0012】

本発明の第二は、前記細胞内膜構造形成方法により形成された細胞内膜構造を蛍光顕微鏡法もしくは電子顕微鏡法、またはそれらを組み合わせた方法により観察する、細胞内膜構造観察方法に関する。

## 【発明の効果】

## 【0013】

本発明によれば、生細胞内の特定の位置に細胞内膜構造を形成することができる、細胞内膜構造形成方法を提供することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0014】

【図1】 ビーズを導入したHeLa/GFP-BAF細胞のタイムラプス観察の蛍光像

【図2】 GFP-BAF陽性なビーズの割合を示すグラフ

【図3】 細胞内膜タンパク質(emerin)の局在を観察した蛍光像

【図4】 emerin陽性なビーズの割合を示すグラフ

【図5】 ビーズを導入したHeLa/GFP-BAF細胞およびHeLa/GFP細胞のビーズ周囲を観察した蛍光像および電子顕微鏡像

【図6】 目的分子の違いに応じて形成された膜構造を観察した電子顕微鏡像

## 【発明を実施するための形態】

## 【0015】

従来の試験内の反応により形成させられる膜構造の種類には限りがあり、また、試験管内と細胞内とは生体分子の組成や空間的な制限に差があるため、試験管内で形成させた膜構造が生細胞内での膜の性質を反映しているとは限らない。また、従来の生体分子を結合させたプラスチックビーズを生きたヒト培養細胞内に導入する方法では、ビーズがオートファジー機構によって捕捉されて分解経路へと取り込まれてしまう。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 6 】

本発明者は、ビーズがオートファジー機構によって捕捉されることなく、生細胞内の特定の位置に細胞内膜構造を形成することができることを見出した。

## 【 0 0 1 7 】

以下、本発明の細胞内膜構造形成方法について詳細に説明する。

## 【 0 0 1 8 】

本発明の細胞内膜構造形成方法は、標識された目的分子を保持する培養細胞を調製する工程と、前記標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子が表面に結合した粒子を前記培養細胞に導入する工程とを有する。

## 【 0 0 1 9 】

## [ 培養細胞の調製 ]

標識された目的分子を保持する培養細胞を調製する工程において、目的分子は、培養細胞に導入する粒子の表面に結合した分子と特異的相互作用を示す分子であればよい。ここで、特異的相互作用としては、例えば、抗原抗体反応、アビジン - ビオチンの反応、ストレプトアビジン - ビオチンの反応、酵素と基質の反応、レクチンと糖鎖の反応、核酸と転写因子の反応等の生体分子間相互作用のほか、生体分子と人工化合物との特異的相互作用等も含められる。

## 【 0 0 2 0 】

目的分子は、前記培養細胞の細胞質内を拡散により移動できる分子であることが好ましく、特に、タンパク質であり、当該培養細胞の核内外物質輸送や核膜形成などに関与するタンパク質等であることがより好ましい。具体的には、BAF (barrier-to-autointegration factor)、Ran (Ras-related nuclear protein)、およびインポーチン (Importin-) 等が挙げられる。これらの中でも、特に、細胞が持つタンパク質分解システムであるオートファジーを回避できることが報告されているBAFが好ましい。

## 【 0 0 2 1 】

標識された目的分子としては、目的分子がタンパク質の場合、例えば、標識となるタンパク質と目的分子との融合タンパク質、標識となるタンパク質と目的分子とが抗原抗体反応やビオチンアビジン反応などにより結合したものが挙げられる。

## 【 0 0 2 2 】

標識された目的分子を保持する培養細胞を調製する方法としては、融合タンパク質をコードする遺伝子を細胞に導入して、当該融合タンパク質を細胞内で発現(合成)させる方法や、マイクロインジェクション等により細胞外で合成した標識された目的分子を細胞に導入する方法等が挙げられる。

## 【 0 0 2 3 】

標識された目的分子が融合タンパク質の場合、標識された目的分子を保持する培養細胞は、公知の遺伝子工学的手法を用いることにより当該融合タンパク質をコードする遺伝子を細胞に導入して、当該融合タンパク質を細胞内で発現(合成)させることにより、調製することが好ましい。これは、細胞への当該融合タンパク質の導入の手間を省ける、導入過程におけるタンパク質の変性を防げる、当該融合タンパク質を安定に発現する細胞株を作製することで再現性の高い結果が得られる、という利点を有するためである。

## 【 0 0 2 4 】

発現は、標識となるタンパク質をコードする遺伝子と目的分子をコードする遺伝子とを人工的に連結した融合遺伝子を作製し、当該融合遺伝子を、発現ベクターのプロモーターの下流に挿入し、培養細胞に導入して融合タンパク質を発現させる方法が適用され得る。

## 【 0 0 2 5 】

また、標識された目的分子が標識となるタンパク質と目的分子とが抗原抗体反応やビオチンアビジン反応などにより結合したものである場合、標識された目的分子を保持する培養細胞は、試験管内で標識した目的分子をマイクロインジェクション等の方法で細胞内に導入することにより、調製することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 6 】

標識としては、培養細胞に導入する粒子の表面に結合した分子との特異的相互作用を示すものが好ましい。また、蛍光イメージングまたは発光イメージングにより目的分子の集積の有無を観察することができるため、緑色蛍光タンパク質（GFP）等の蛍光タンパク質、またはルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、ジアホラーゼ、パーオキシダーゼ等の発光タンパク質等各種の蛍光物質や発光物質を用いることがより好ましい。

## 【 0 0 2 7 】

培養細胞の由来としては特に限定されず、ヒト、マウス等の動物細胞、特に哺乳類培養細胞が挙げられる。例えば、市販のトランスフェクション試薬の説明書に言及がある培養細胞であれば用いることができるが、外来物質の取り込み活性がある程度高い細胞を使用することが好ましい。例えば、上皮様付着細胞であるHeLa細胞やHEK293細胞等を、再現性良く使用することができる。

10

## 【 0 0 2 8 】

## 〔 粒子 〕

粒子は、培養細胞に由来するミトコンドリア等の細胞内粒子とは異なり、細胞外に存在するものであり、一般には、定形又は不定形の固体粒子を指す。その材料や性状は特に限定されず、例えばプラスチック等の有機物、ガラス、金属等の無機物からなるものであってよい。また、珪素等を加えて強化したりポソームや、磁気を帯びた粒子、蛍光標識された粒子を使用することも可能である。

20

## 【 0 0 2 9 】

粒子は、具体的には、ポリスチレンビーズ等のプラスチックビーズ、酸化鉄等の磁性体を含むポリスチレンビーズ等の磁気ビーズ、これらのビーズ表面がカルボキシル基やアミノ基等の親水性官能基を有するように処理されたもの、金、白金、コバルト等の金属からなる粒子等が挙げられる。これらの中でも、ビーズの材質自体が細胞へ与える影響を極力抑えるため、ポリスチレンビーズ等の生物学的に不活性な材質から成るビーズが好ましい。

## 【 0 0 3 0 】

粒子の直径は、目的の培養細胞の大きさに応じて適宜選択することができるが、例えば培養細胞の大きさが10～50μm程度の範囲にあり、球状の粒子を用いる場合、数十nm～10μmであればよい。しかし小さすぎると、複数個の粒子が凝集しやすくなる傾向が生じる、また、粒子の周知に形成される細胞内膜構造が小さく顕微鏡観時に検出感度が低下するため、好ましくは500nm以上5μm以下の範囲であり、より好ましくは1μm以上3μm以下の範囲である。

30

## 【 0 0 3 1 】

粒子の表面に結合した分子としては、標識された目的分子との間で特異的相互作用を示すものであれば、限定されない。生体への親和性の観点から、生体分子であることが好ましく、例えば、タンパク質、DNA、RNA、脂質、糖、アミノ酸、およびこれらの組合せ等、生体中に存在するあらゆる分子が挙げられるが、標識された目的分子との相互作用を考慮して、当該標識または目的分子に応じて選択することが好ましい。具体的には、標識された目的分子の標識が蛍光タンパク質である場合、粒子の表面に結合した分子は蛍光タンパク質に対する抗体等が挙げられ、目的分子に施された標識が緑色蛍光タンパク質（GFP）であれば、抗GFP抗体を、赤色蛍光タンパク質（RFP）であれば、抗RFP抗体を選択することができる。

40

## 【 0 0 3 2 】

なお、生体分子とは、生体から直接分離した化合物のみを指すものではなく、生体中に元来含まれ得る化合物であれば化学的に合成された化合物であってもよい。

## 【 0 0 3 3 】

粒子の表面に結合した、標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子の結合量としては、特に限定されないが、例えば、酸化鉄等の磁性体を含む直径2.8μmのポ

50

リスチレンビーズの場合、ビーズ1mg分あたり、0.4~8µgの量の抗体(IgG)を結合させたものなどを用いることができる。

#### 【0034】

粒子の表面に、標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子を結合する方法としては、特に限定されないが、化学的または物理的に結合しているものが好ましい。例えば、プラスチックビーズまたは磁気ビーズ粒子の表面に架橋剤による反応等を利用して生体分子を直接共有結合させる方法、プロテインG結合ビーズを利用したプロテインG-抗体相互作用、もしくは、ストレプトアビジン結合ビーズを利用したストレプトアビジン-ビオチン相互作用等の相互作用を利用して生体分子を粒子の表面に間接的に結合させる方法、また、その他タンパク質の精製において一般に使われているような相互作用を利用して生体分子を粒子の表面に間接的に結合させる方法等が挙げられる。

10

#### 【0035】

##### [導入]

標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子が表面に結合した粒子を培養細胞に導入する方法としては、例えば従来法のインジェクション法を用いることも考えられるが、培養細胞にトランスフェクション試薬を作用させる方法を用いることが好ましい。トランスフェクション試薬とは従来、外来のDNAやRNA、タンパク質などを培養細胞に導入することを目的に使用されているものである。トランスフェクション試薬により粒子を導入するにあたっては、トランスフェクション試薬の種類と粒子表面の性質を適宜選択することができる。トランスフェクション試薬としては特に限定されず、陽イオン性リポソーム、リン酸カルシウム、ポリリジン複合体を用いた物等が挙げられる。具体的な商品名としては、リポソーマル・トランスフェクション試薬であるDOTAP:N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl ammonium methyl sulfate、同じくリポソーマル・トランスフェクション試薬であるLipofectamine(登録商標)2000(invitrogen社)、非リポソーマル・トランスフェクション試薬であるEffectene(登録商標)(QIAGEN社)等が挙げられる。また、目的分子や粒子表面に結合している分子の性質に応じて、Lipofectamine(登録商標)Plusや、Oligofectamine(登録商標)、Lipofectamine(登録商標)RNAiMAXなどといった、ペプチドあるいはRNAを細胞に導入する際に汎用されている試薬等を用いることができる。

20

30

#### 【0036】

以上の中では、特にLipofectamine(登録商標)2000とEffecteneが好ましい。前記のEffecteneには、取り込み効率を改善する試薬としてenhancerと呼ばれる試薬が添付されているが、本開示の培養細胞への粒子の導入効率に対する前記enhancerの有無による影響は確認されなかった。

#### 【0037】

なお、リポソーマル・トランスフェクション試薬とは、DNA等の負電荷を持つ物質と混合した場合にリポソーム様の構造をとり、これによってDNA等の、細胞への取り込みを可能にするものとして知られている試薬をいい、一方、非リポソーマル・トランスフェクション試薬とは、前記のようなリポソーム様の構造ではない複合体の形態において細胞への取り込みを可能にする試薬のことをいう。

40

#### 【0038】

トランスフェクション試薬を作用させる場合、従来知られているトランスフェクション試薬の使用量(DNA等を導入するための使用量)を参考に適宜決定すればよく、特に制限はない。市販品のトランスフェクション試薬を使用する場合にはメーカーが推奨する反応液量を参考に添加量を調整すればよく、使用する粒子の種類や、導入すべき粒子の量に応じて適宜変更することができる。

#### 【0039】

標識された目的分子を保持する培養細胞を調製し、前記標識された目的分子との間で特

50

異的相互作用を示す分子が表面に結合した粒子を前記培養細胞に導入することにより、培養細胞内において、前記粒子の周囲にオートファジー関連タンパク質（オートファゴソームの膜を構成するタンパク質やリソソームを構成するタンパク質）ではなく、粒子の周囲に集積した目的分子との相互作用により、細胞内膜を構成するタンパク質、細胞内膜を構成するリン脂質等を粒子の周囲に集めることができ、細胞内で膜構造を形成することができる。また、当該膜構造は、ビーズ表面の形状に沿うようにして形成することができる。なお、粒子の周囲とは、粒子の外周全体または一部のいずれの場合も含む。

#### 【0040】

##### [細胞内膜構造]

標識された目的分子を保持する培養細胞を調製する工程と、前記標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子が表面に結合した粒子を前記培養細胞に導入する工程とにより、膜構造を試験管内で形成させるのに比べ、生細胞内で生じる生命現象を反映した膜構造を観察することができる。また、膜構造を試験管内で形成させる場合に必要な、個々のタンパク質に応じた調製条件（合成条件、精製条件、保存条件など）の最適化のステップを大幅に省略することができ、時間や費用を低減することができる。

10

#### 【0041】

##### [観察方法]

粒子の周囲に形成された細胞内膜構造は、蛍光顕微鏡法もしくは電子顕微鏡法、またはそれらを組み合わせた方法により観察することができる。いずれの方法においても、培養細胞に取り込まれた粒子を基準点とすることによって、常時流動し変化している細胞の内部であっても定点観察することができる。

20

#### 【0042】

蛍光顕微鏡法によれば、目的分子、粒子に結合した標識された目的分子との間で特異的相互作用を示す分子、または粒子の少なくともいずれか1つを蛍光標識することにより、標識した対象物の局在や移動、その他定量的な解析が可能になり、生細胞内の膜構造の形成過程における情報を得ることが容易である。

#### 【0043】

電子顕微鏡法においては、培養細胞の固定、各種染色、樹脂包埋、超薄切片の作製等の操作を行って調製したサンプルを観察することにより、非常に高い空間分解能で細胞内構造を観察することができる。特に、細胞内膜構造の観察に適しており、後述するように蛍光顕微鏡法と組み合わせて用いることで、細胞内膜構造の形成過程の解析に有効に利用できる。

30

#### 【0044】

蛍光顕微鏡法および電子顕微鏡法を組み合わせた方法として、CLEM法、Live CLEM法等が挙げられる。

#### 【0045】

本発明の細胞内膜構造の観察は、蛍光顕微鏡法と電子顕微鏡法を組み合わせた方法によるのが好ましい。特に、Live CLEM法を用いるのが好ましい。Live CLEM法は、特定の細胞について生きたままの状態での蛍光顕微鏡による観察を行なった後に、その細胞を固定し、蛍光観察したのと同じ場所を電子顕微鏡で観察するものである。これにより、生細胞内における観察対象の状態を把握した上で、対象およびその周囲の様細胞内構造を電子顕微鏡法により高い空間分解能で観察することができる。細胞の固定は、例えばグルタルアルデヒドを加えることにより瞬間的に行うことができる。また、Live CLEM法では、基本的に、一連の試料作製の過程で界面活性剤を使用しないため、膜構造が本来の状態に保たれ、その特定の細胞について、蛍光顕微鏡で得られる情報のみならず、蛍光顕微鏡法では観察が困難な細胞内膜構造を観察することができる。

40

#### 【実施例】

#### 【0046】

本発明を実施例に基づき、更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

50

## 【0047】

## [培養細胞の調製]

以下のとおり、ヒト培養細胞を用いて、各種培養細胞を調製した。

## 【0048】

## (HeLa/GFP細胞)

GFPをコードするプラスミドDNAを理研セルバンクから入手したHeLa細胞に導入してGFPを発現させHeLa/GFP細胞を調製した。発現については、プラスミドDNAとしては市販のpEGFPベクター(Clontech社)を使用し、プラスミドDNAの細胞への導入はEffectene transfection reagent kit(QIAGEN社、301425)を使用した。HeLa/GFP細胞は、100% (vol/vol)のウシ胎仔血清(FBS)と200 µg/mlのGeneticin(登録商標)(Life Technologies社、11811-031)を含むDMEM培地で培養した。

10

## 【0049】

## (HeLa/GFP-BAF細胞)

HeLa/GFP細胞における発現と同様の手順で、GFP-BAFをコードするプラスミドDNAを理研セルバンクから入手したHeLa細胞に導入してGFP-BAFを発現させHeLa/GFP-BAF細胞を調製した。HeLa/GFP-BAF細胞は、100% (vol/vol)のウシ胎仔血清(FBS)を含むDMEM培地で培養した。ここで、GFP-BAFとは、緑色蛍光タンパク質(GFP)とタンパク質BAFとの融合タンパク質である。

20

## 【0050】

## (HeLa/GFP-Ran細胞)

HeLa/GFP細胞における発現と同様の手順で、GFP-RanをコードするプラスミドDNAを理研セルバンクから入手したHeLa細胞に導入してGFP-Ranを発現させHeLa/GFP-Ran細胞を調製した。HeLa/GFP-Ran細胞は、100% (vol/vol)のウシ胎仔血清(FBS)を含むDMEM培地で培養した。ここで、GFP-Ranとは、緑色蛍光タンパク質(GFP)とタンパク質Ranとの融合タンパク質である。

30

## 【0051】

## (HeLa/GFP-Importin-細胞)

GFP-Importin- をコードするプラスミドDNAを理研セルバンクから入手したHeLa細胞に導入してGFP-Importin- を発現させHeLa/GFP-Importin- 細胞を調製した。HeLa/GFP-Importin- 細胞は、100% (vol/vol)のウシ胎仔血清(FBS)を含むDMEM培地で培養した。ここで、GFP-Importin- とは、緑色蛍光タンパク質(GFP)とタンパク質Importin- との融合タンパク質である。

## 【0052】

## [粒子]

## &lt;抗GFP抗体結合ビーズの調製&gt;

## (抗GFP抗体が表面に直接結合した磁気ビーズ)

抗GFP抗体が表面に直接結合した磁気ビーズのビーズ懸濁液Aを以下のようにして調製した。

40

1) 5 µlのAnti-GFP-Magnetic beads(直径3 µm; MBL社、D153-9)をエッペンチューブに入れ、マグネットを用いて磁気ビーズを回収した。

2) 上清を除去し、回収したビーズにPBS(pH 7.4)を加えて再懸濁した。

3) 前記1)および2)と同様の操作を計3回行い、最終的に50 µlのPBS(pH 7.4)で再懸濁して、ビーズ懸濁液Aを調製した。

## 【0053】

50



(抗 GFP 抗体がプロテイン G - 抗体相互作用を利用して表面に結合した磁気ビーズ)  
抗 GFP 抗体がプロテイン G - 抗体相互作用を利用して表面に結合した磁気ビーズのビーズ懸濁液 B を以下のようにして調製した。

【0054】

Dynabeads Protein G (直径  $2.8 \mu\text{m}$ ; Dynal 社、DB10003) について、ビーズ懸濁液 A と同様の処理をして得られたビーズ懸濁液に、抗 GFP 抗体 (MBL 社、598) を、ビーズ  $1 \text{mg}$  に対して  $80 \mu\text{g}$  の比で混合し、1 時間室温下でインキュベートした後、PBS (pH 7.4) による洗浄を行って、ビーズ懸濁液 B を調製した。

【0055】

[実験 1]

(細胞へのビーズ導入)

以下のとおり、Effectene 法により細胞へのビーズ導入を行った。

- 1) ビーズ導入処理の前日に、HeLa/GFP-BAF 細胞を  $2 \times 10^5 / \text{dish}$  の濃度になるように調製して、 $35 \text{mm glass bottom dish}$  (MatTek 社) へ播種した。
- 2) DNA 溶液の代わりにビーズ懸濁液 A を使用した以外は、Effectene transfection reagent kit (QIAGEN 社、301425) の説明書に従って、ビーズ懸濁液 A とキット中の各種溶液とを混合し、室温で 15 分静置した。これをビーズ懸濁液 A - 2 とした。
- 3) 前記 1) で用意した dish の培地をビーズ懸濁液 A - 2 と交換した。
- 4)  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で  $37^\circ\text{C}$ 、1 時間静置した。
- 5) dish 上の細胞を 10% (vol/vol) FBS を含む DMEM 培地で 2 回洗浄した。

【0056】

(蛍光顕微鏡による観察 (ライブセルイメージング))

- 1) 細胞へのビーズ導入の処理後、培地を観察用培地 ( $20 \text{mM HEPES}$  (pH 7.3)、フェノールレッド不含 DMEM、10% FBS、 $80 \mu\text{g/ml}$  カナマイシン硫酸塩) で置換した後、 $\text{CO}_2$  インキュベータ内で観察開始まで静置した。
- 2) 観察用培地の上にミネラルオイルを重層した。
- 3) ミネラルオイル重層した dish を蛍光顕微鏡のステージ上に置いた。
- 4)  $37^\circ\text{C}$  下で観察した。蛍光顕微鏡観察には、DeltaVision Core microscope system (Applied Precision 社) を用い、レンズは、Olympus oil immersion objective lens UApo/340 (倍率 40 倍、 $\text{NA} = 1.35$ )、光学フィルターは、DeltaVision (登録商標) の GFP を観察するための標準的な仕様のフィルターセットを用いた。

【0057】

<実験 1 - 1> タイムラプス観察

前記細胞へのビーズ導入の後、前記蛍光顕微鏡による観察を行い、観察開始から 1 分間隔で蛍光像を撮像した (タイムラプス観察)。結果は、図 1 に示す。図中のバーの長さは、 $10 \mu\text{m}$  である。時間「0 min」は、細胞へのビーズ導入の前記 5) の洗浄操作を行ってから約 1 時間の時点を示す。各撮像図「1」「2」および「3」は、順に経時変化であり、各撮像図「1」「2」および「3」は、特定の時間帯 (ビーズ周囲で顕著なシグナル変化が見られた時間帯) の像のみを示している。

【0058】

白抜き矢印で示すように、時間「0 min」では、ビーズ周囲にシグナル (GFP-BAF 由来の蛍光) が見られなかったのに対し、時間の経過と共に、ビーズ周囲へのシグナルの集積が見られた。時間の経過と共に、細胞に取り込まれたビーズ表面に GFP-BAF が集積したことが分かる。なお、ビーズの右側にある大きな楕円形の領域は細胞核に相

10

20

30

40

50

当する。

【0059】

<実験1-2> GFP-BAF陽性なビーズの割合

前記細胞へのビーズ導入の処理後、細胞に導入された複数のビーズについて前記蛍光顕微鏡による観察を行った。様々な時点で、後述する「ビーズ位置判定法」による染色を行い、細胞を4% (wt/vol)ホルムアルデヒド固定して、蛍光顕微鏡によりGFP-BAF陽性なビーズの数を調べた。結果は、図2に示す。横軸は、前記細胞へのビーズ導入の前記5)の洗浄操作を行った時点を経験時間0として、そこから経過時間(単位は時間(h))、縦軸は、細胞内に取り込まれたビーズ(incorporated beads)の個数における、GFP-BAFの集積が確認されたビーズ(GFP-BAF-positive anti-GFP-beads)の個数の割合(%)を示す。なお、「細胞内に取り込まれたビーズ(incorporated beads)」は、ビーズの位置判定法のRhodamineで染まらなかったものである。

10

【0060】

(ビーズ位置判定法)

本ビーズ位置判定法は、細胞への物質取り込みを阻害した条件下(4)で、細胞表面のみをRhodamineで染色することにより、細胞外に接着しているビーズ(Rhodamineで染まる)と、細胞内に取り込まれたビーズ(Rhodamineで染まらない)とを染め分けることができる方法である。

1)前記細胞へのビーズ導入の処理を行った後、細胞を氷冷PBS(pH7.4)で2回(各2ml)洗浄した。

20

2)液を完全に吸い取り、100μlの100μg/ml Sulfo NHS-LC-Biotin/PBS(pH8.0)を加え、4で10分静置した。

3)細胞を氷冷PBS(pH7.4)で2回(各2ml)洗浄した。

4)液を完全に吸い取り、10μg/ml Streptavidin-Rhodamineを加え、4で10分静置した。

5)細胞を氷冷PBS(pH7.4)で1回(2ml)洗浄した。

6)4%(wt/vol)ホルムアルデヒド/PBS(pH7.4)で、室温で15分固定した。

7)PBS(pH7.4)で3回洗浄し、観察までPBS中4で保存した。

30

【0061】

[実験2]

<実験2-1>細胞内膜タンパク質(emerin)の局在の観察

ビーズを導入したHeLa/GFP-BAF細胞およびHeLa/GFP細胞を対象に、細胞内膜タンパク質(emerin)の局在を観察した。

【0062】

HeLa/GFP-BAF細胞およびHeLa/GFP細胞(control)のそれぞれについて、[実験1]細胞へのビーズ導入の処理と同様に前記5)の洗浄操作を行い、それから2時間後に細胞を4%(wt/vol)ホルムアルデヒド固定して、後述するanti-emerin-antibody(ED1)を用いた細胞の免疫染色、およびDNAについてはDNA特異的染色試薬であるDAPIを用いた染色を行った。[実験1]蛍光顕微鏡による観察と同様の手順により、蛍光像を撮像した。免疫染色サンプル(固定後のサンプル)の観察には、Olympus oil-immersion objective lens PLAPON60XO SC(倍率60倍、NA=1.40)を使用した。光学フィルターは、DeltaVision(登録商標)のGFPを観察するための標準的な仕様のフィルターセットを用いた。結果は、図3に示す。図中のバーの長さは、10μmである。白抜き矢印で示すように、HeLa/GFP-BAF細胞においては、GFP由来のシグナル(GFP-BAF陽性)およびemerin陽性であることが確認できたが((2)および(3)上段)、三角矢印で示すように、HeLa/GFP細胞においては、GFP由来のシグナル(GFP陽性)は確認できたが、emerin陰

40

50

性であった（（2）および（3）下段）。

【0063】

（細胞の免疫染色）

1) 細胞が生育しているdishに、ホルムアルデヒドの終濃度が4% (wt/vol) になるようにホルムアルデヒド水溶液を添加することで細胞を化学固定し（ホルムアルデヒド固定）、室温で15minインキュベートした。

2) 溶液を2mlのPBS (pH7.4)と置換し、室温で5分間洗浄した後、同様の洗浄操作を計3回行った。その後、0.1% Triton X-100 / PBS (pH7.4) で室温5分インキュベートした。

3) PBS (pH7.4) で5分×3回洗浄後、1% BSA / PBS (pH7.4) で室温で1時間インキュベートした。

4) Anti-emerin antibody等の抗体を1% BSA / PBS (pH7.4) で100~500倍程度希釈して得た抗体溶液を、3)の細胞が生育しているdishに入れ、4で一晚静置し、dish上の細胞を染色した。

5) 一晚静置後、PBS (pH7.4) で5分×3回洗浄後、室温で3時間二次抗体反応を行った後、PBS (pH7.4) で5分×3回洗浄した。二次抗体溶液としては、Alexa594で標識された抗ラビットIgG抗体 (Invitrogen社) を1% BSA / PBS (pH7.4) で1000倍希釈した溶液を用いた。

【0064】

<実験2-2> emerin陽性なビーズの割合

<実験2-1>の手順と同様にして、GFP-BAFあるいはGFP陽性となったビーズにおけるemerin陽性となったビーズの割合を調べた。結果は図4に示す。データは、独立した三回の実験を行った平均±標準偏差の形で示しており、各実験においてGFP-BAFあるいはGFP陽性となった50個のビーズについて調べた。

【0065】

[実験3] ビーズを導入したHeLa / GFP-BAF細胞およびHeLa / GFP細胞のビーズ周囲の観察

【0066】

HeLa / GFP-BAF細胞およびHeLa / GFP細胞 (control) のそれぞれについて、[実験1]の細胞へのビーズ導入と同様の処理を行った後、[実験1] 蛍光顕微鏡による観察と同様の手順により、GFP-BAF陽性またはGFP陽性なビーズを確認してから1時間が経過した時点で細胞を2.5 (wt/vol) グルタルアルデヒドで固定し、後述するLive CLEM法により、蛍光像および電子顕微鏡像を撮像した。結果は、図5に示す。図中のバーの長さは、蛍光像は2 μm、全体像は1 μm、ならびに拡大図は100 nmである。

【0067】

図5中、「蛍光像」は、GFP-BAF (上段の蛍光像) あるいはGFP (下段の蛍光像) のビーズ周囲への集積を示し、「電子顕微鏡像」は、蛍光像で示したのと同じビーズについて、電子顕微鏡法により細胞内構造を (特に、膜構造に注目して) 観察した結果を示す。また、電子顕微鏡像については、「ビーズの全体像」および一部分の「拡大像」を示し、拡大像のうち、注目している部分を模式図として示している。拡大図および模式図中、矢印または三角矢印が注目している膜構造 (脂質二重層が二枚ある、二重膜構造) を示す。上段の模式図は、BAFに依存的に形成される膜構造、下段の模式図は、オートファジーに典型的な膜構造、白抜き矢印はビーズ表面に集積させた目的分子 (GFP-BAF等) と思われる電子密度の物体が存在する領域を示す。

【0068】

図5に示されるとおり、GFP-BAFではビーズ表面に集積したGFP-BAFに依存して膜構造が形成されるため、ビーズ表面をぴったりと覆うような膜が形成されているのに対し (上段の全体像)、GFP (Control) ではそのような膜の形成は見られず、オートファジー関連の膜構造がビーズのある領域一帯を覆うように形成されている (

下段の全体像) ことが分かる。これは、オートファジー関連の膜構造形成のターゲットとなっているのが、ビーズそのものではなく、ビーズ周囲に残存しているエンドソーム膜の断片だからであると考えられる。

#### 【0069】

(Live CLEM法による観察)

##### 1) 蛍光顕微鏡による観察

細胞を2.5 (wt/vol) グルタルアルデヒドで固定した後、蛍光顕微鏡として、Olympus oil-immersion objective lens PLAPON60XO SC (倍率60倍、NA=1.40を用いて、三次元画像(0.2 μm 10  
間隔で40-60の焦点面)を撮像した。この画像について、当該蛍光顕微鏡システムに搭載されたソフトを用いて非焦点面に由来するシグナルを除去した。

#### 【0070】

##### 2) 電子顕微鏡による観察

試料は、1% OsO<sub>4</sub> (日新EM社、3002) で固定し、2% (wt/vol) 酢酸ウラニル (Merck、8473-1M) で染色して、EPON812 (TAAB、T024) で包埋した。蛍光顕微鏡によって観察された細胞と同一の細胞をカバーガラス上の番地からから特定した。80 nmの切片を作製し、2% 酢酸ウラニルとクエン酸鉛 (Sigma-Aldrich、18-0875-2) で染色した。電子顕微鏡像は、透過型電子顕微鏡 (80 kV、JEOL、JEM-1400) を用いた。蛍光像と相間がある電子顕微鏡像が得られた。 20

#### 【0071】

[実験4] 目的分子の違いによる膜構造の観察

HeLa/GFP-BAF細胞に、抗GFP抗体がプロテインG-抗体相互作用を利用して表面に結合した磁気ビーズを導入した。導入は、ビーズ懸濁液Aに代えてビーズ懸濁液Bを用いた以外は、[実験1]の細胞へのビーズ導入の処理と同様に行った。細胞をグルタルアルデヒド固定した後、[実験3]のLive CLEM法の電子顕微鏡による観察と同様に、試料を調製して電子顕微鏡像を撮像した。結果は、図6(1)に示す。図中のバーの長さは、100 nmである。

#### 【0072】

HeLa/GFP-Ran細胞、抗GFP抗体がプロテインG-抗体相互作用を利用して表面に結合した磁気ビーズを導入した。導入は、HeLa/GFP-BAF細胞に代えて、HeLa/GFP-Ran細胞を用い、ビーズ懸濁液Aに代えてビーズ懸濁液Bを用いた以外は、[実験1]の細胞へのビーズ導入の処理と同様に行った。細胞をグルタルアルデヒド固定した後、[実験3]のLive CLEM法の電子顕微鏡による観察と同様に試料を調製し、電子顕微鏡像を撮像した。結果は、図6(2)に示す。図中のバーの長さは、100 nmである。 30

#### 【0073】

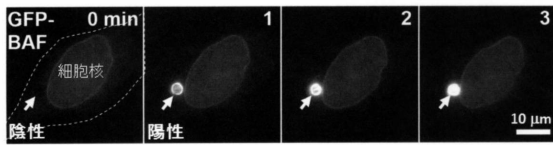
HeLa/GFP-Importin-細胞、抗GFP抗体が表面に直接結合した磁気ビーズを導入した。導入は、HeLa/GFP-BAF細胞に代えて、HeLa/GFP-Importin-細胞を用いた以外は、[実験1]の細胞へのビーズ導入の処理と同様に行った。細胞をグルタルアルデヒド固定した後、[実験3]のLive CLEM法の電子顕微鏡による観察と同様に試料を調製し、電子顕微鏡像を撮像した。結果は、図6(3)に示す。図中のバーの長さは、100 nmである。 40

#### 【0074】

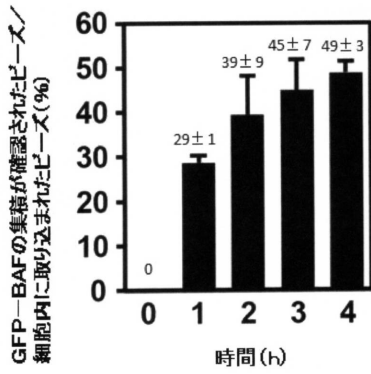
図6から分かるように、発現させた目的分子の種類に応じて、様々な形態の細胞内膜構造がビーズ(粒子)の周囲に形成された。RanやImportin-は、核内外物質輸送や核膜形成などに関与していると言われているタンパク質であり、図6に示されるとおり、核膜孔複合体様の構造体(矢印)を含み、発現(集積)させた目的分子に応じてそれぞれ異なる膜構造がビーズ周囲に形成された。GFP-RanおよびGFP-Importin-を発現させた場合のいずれも、GFP-BAFを発現させた場合と同様に、 50

オートファジー関連とは異なる膜構造が形成されたことが分かる。

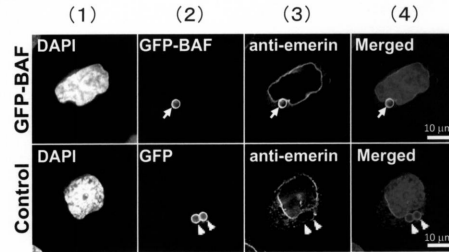
【 図 1 】



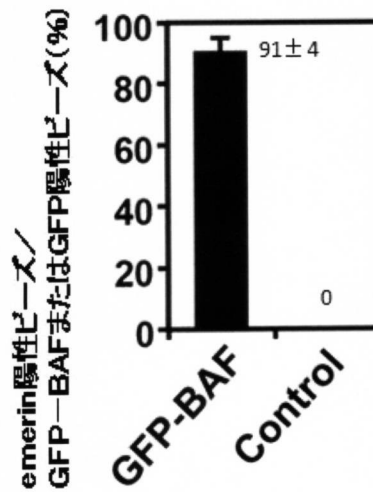
【 図 2 】



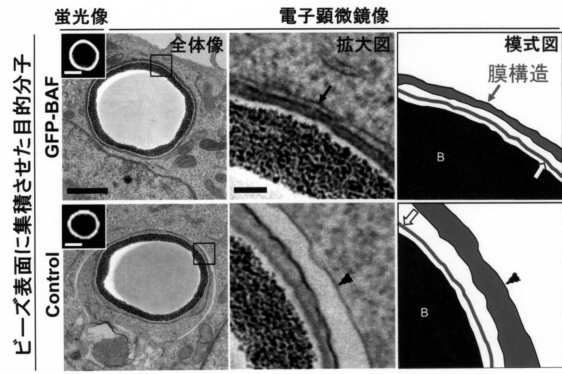
【 図 3 】



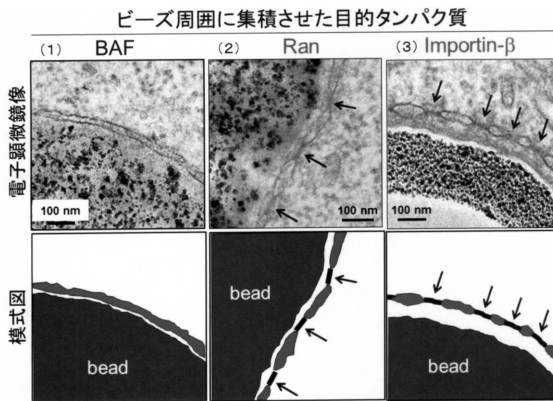
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



---

フロントページの続き

特許法第30条第2項適用申請有り ウェブサイトの掲載日 平成27年1月6日 ウェブサイトのアドレス  
<https://kaken.nii.ac.jp/d/p/25650073/2013/11/ja.ja.html> <http://support.nii.ac.jp/ja/news/kaken> ウェブサイ  
トの掲載日 平成27年5月19日 ウェブサイトのアドレス <http://www.nict.go.jp/press/2015/05/19-1.html> 発行日 平成27年5月19日 刊行物 Procee  
dings of the National Academy of Sciences, 2015, Vol  
.112, No.22, pp.7027-7032, National Academy of Scienc  
es

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 DA03 EA04 GA11 GA13 HA20